

15-4 成人難治性白血病の分子生物学的特徴に基づく治療法に関する研究

主任研究者 名古屋大学大学院医学系研究科 直 江 知 樹

研究成果の要旨

本研究においては、白血病の発症・進展・耐性化における分子・細胞学的な病態を解明するとともに、治療標的となりうる分子（群）および標的方法の探索・開発に関する研究を行うことを目的とした。治療標的分子としては、急性骨髄性白血病（AML）では最も変異頻度の高い FLT3 分子、t(6;12)(q21;p13)転座より同定した新規融合遺伝子産物 ETV6/FRK、白血病細胞に発現するオーファン G 蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)、白血病で高発現するテロメラーゼを選び、これらを標的とした治療法の開発、標的とした場合の白血病細胞死の誘導などについて検討した。一方、臨床研究として日本成人白血病研究グループ（JALSG）との共同で、フィラデルフィア（Ph）染色体陽性急性リンパ性白血病（ALL）に対する、Abl キナーゼ阻害剤併用化学療法の有効性と安全性を検討し、さらに de novo AML における FLT3 遺伝子変異の臨床的意義を前方視的に解析した。

研究者名および所属施設

研究者名		所属施設および職名	分担研究課題
直江知樹		名古屋大学大学院医学系研究科 教授	白血病シグナル伝達を標的とした治療法の開発と研究の総括 の研究
北林一生	*1	国立がんセンター研究所分子腫瘍学部 部長	白血病関連因子 AML1・PML・MLL の機能に関する研究
吉田 均	*2	国立がんセンター研究所分子腫瘍学部 室長	造血器特異的腫瘍抑制遺伝子 SHIP の発現制御
黒川峰夫		東京大学医学部附属病院 講師	白血病の分子機構の解明と診断・治療への応用の研究
宮崎泰司		長崎大学医学部歯学部附属病院 講師	白血病予後因子におけるミエロペルオキシダーゼの意義
大西一功		浜松医科大学 助教授	造血器腫瘍におけるオーファン G 蛋白質共役型受容体の検討
大屋敷一馬		東京医科大学 教授	テロメラーゼを標的とした難治性白血病の分子標的療法の開発
伊藤欣朗	*3	国立大竹病院	CML の CD34 陽性細胞における Type-1 interferon レセプター発現の 解析
横澤敏也	*2	国立病院機構名古屋医療センター 室長	imatinib 投与中の慢性骨髄性白血病における BCR-ABL の発現 量の推移と薬剤耐性の発症に関する解析

*1:平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2:平成16年4月1日～平成17年3月31日

*3:平成15年4月1日～平成15年10月31日

総括研究報告

1 研究目的

化学療法や造血幹細胞移植の進歩によって、60歳未満の成人急性白血病における5年生存率は30%を達成したが、わが国あるいは欧米での大規模臨床研究によればこの10年以上、その成績は改善していない。また、増加しつつある高齢者白血病の成績は未だに不良である。一方、この20年間に白血病の分子病態と多様性が明らかになってきた。さらに急性前骨髄球性白血病に対するオールトランスレチノイン酸あるいは慢性骨髄性白血病に対するAblキナーゼ阻害剤はいずれも白血病の原因分子を標的とした治療法であり、臨床成績を飛躍的に向上させることもわかってきた。これらのことは、白血病の分子病態に基づく新しい薬剤開発が、白血病治療のブレイクスルーを生むであろうことを示唆する。本研究においては、白血病の発症・進展・耐性化における分子・細胞学的な病態を解明するとともに、治療標的となりうる分子(群)および標的方法の探索・開発に関する前臨床研究を行うことを第一の目的とした。また日本成人白血病研究グループ(JALSG)との共同で、分子病態の臨床的意義の研究ならびに白血病の治療に関する臨床研究(とりわけ第II相試験)を推進することを第二の目的とした。

2 研究成果

1) 受容体型チロシンキナーゼFLT3に関する研究

活性型FLT3を有する細胞株を用いて、FLT3阻害剤のハイスループットスクリーニングを行い、複数の阻害剤を得ることができた。これらの化合物について、構造としての新規性、キナーゼ阻害剤としてのスペクトラム、点突然変異FLT3に対する感受性、AGP結合性によって、数種の化合物に限定して、マウスFLT3白血病モデルでの有効性・毒性試験を行い、これらの基準を満たす阻害剤が得られた。

次に、AMLにおけるFLT3遺伝子発現量の意義と阻害剤の適応の可能性について明らかにするために、AML細胞におけるFLT3遺伝子発現量をreal time PCR法を用いて定量化した。AML細胞におけるFLT3遺伝子発現量は正常細胞に比較して有意に高く、特にFLT3遺伝子変異を有する細胞に高い傾向を認めた。また、FLT3遺伝子変異を持たないAML細胞においても、FLT3遺伝子を強発現する症例が存在し、その産物は恒常的に活性化を示すとともに、FLT3阻害剤への感受性を示すことを確認し、FLT3遺伝子の高発現はFLT3遺伝子異常を伴わないAML例における予

後不良因子であることを明らかにした。

2) 白血病に認められたt(6;12)(q21;p13)転座が形成するETV6/FRK融合蛋白の機能解析

ETV6/FRKはt(6;12)(q21;p13)転座を有する急性白血病細胞から我々が同定したETV6とFRKとの新規融合遺伝子である。これは、SrcファミリーのチロシンキナーゼをコードするFRKがヒト悪性腫瘍で構造変化を受ける異常として初めての報告例であるが、今回、融合蛋白ETV6/FRKの機能解析を行った。ETV6/FRKにおいては、ETV6のPNTドメイン、FRKのSH2ドメインの一部、キナーゼドメインがin-frameに融合している。ETV6/FRKの機能について検討し、(1)チロシンキナーゼ活性の異常、(2)癌抑制機能を有するとされているETV6の機能のdominant negativeな制御、というdualなメカニズムから白血病発症に関わっている可能性が示唆された。

3) 転座標的遺伝子AML1の機能解析

AML1の機能の解明を目的として、AML1複合体を精製することによりAML1と結合する因子を検索した。これまでにヒストンアセチル化酵素p300/CBP及びMOZがAML1複合体に含まれることを報告しているが、さらにAML1複合体中に含まれるp125 kDaのポリペプチドの質量分析による解析から、新たにt(15;17)転座における標的遺伝子の産物PMLがAML1複合体に含まれることを見いだした。PMLはAML1とその転写共役因子であるp300/CBPをnuclear bodyに集積させることにより複合体形成を促進し、AML1を介した転写を活性化して分化を誘導する。急性骨髄性白血病の約50%でAML1複合体の構成因子のいずれかに異常が認められると考えられる。このようにAML1複合体は急性白血病における染色体転座や遺伝子への主要な標的であり、AML1複合体の機能異常が白血病発症に深く関与することが示唆された。

4) COX-2を標的とした治療法の開発

Cyclooxygenase-2 (COX-2)は、アポトーシスに関与し、悪性腫瘍の増殖に影響することが報告され、COX-2が癌治療のTarget分子の一つと考えられている。我々はCOX-2阻害剤による白血病細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。使用した白血病細胞株はK562, NB4, U937, HL60, CEM細胞、COX-2阻害剤は本邦において臨床使用可能なetodolacとmeloxicamを用いた。Etodolacの抗腫瘍効果は濃度依存的に認められ、作用機序として、i) anti-apoptoticなbcl-2の発現抑制、ii) caspase-9、-7および-3の活性化、iii) caspase抑制剤、c-IAP-1およびsurvivinの発現抑制、iv) bcl-2蛋白の発現抑制に続くミトコンドリアの膜電位の低下、等が関与し、

アポトーシスを誘導することが考えられた。

5) テロメラーゼを標的とした治療法の開発

テロメラーゼはほとんどの正常体細胞では活性が極めて低く、多くの造血器腫瘍で活性が報告されている。従って、テロメラーゼは造血器腫瘍を含めた悪性腫瘍に対する治療を行う上で標的分子の可能性もある。Telomestatin はテロメラーゼ阻害活性を有する放線菌 *Streptomyces anulatus* が産生する天然活性物質であるが、培養細胞株や新鮮白血病細胞に対して、アポトーシス誘導細胞の増加とテロメア長の短縮を起こした。U937 細胞株のヌードマウス移植モデルに対して、抗腫瘍効果が認められた。Primary leukemia cell を用いた場合、サブテロメア領域を含めた TRF がわずか 10 日間で 7 kb も短縮することから telomestatin によるテロメア短縮にはただ単にテロメラーゼ阻害効果以外にサブテロメア切断によるテロメア短縮機構が関与していることが推察された。そこで telomestatin は即効性を有するテロメラーゼ阻害剤として期待できることが明らかとなった。

6) AML における予後因子の解析

JALSG AML87,89,92 プロトコールに登録された症例で病型中央診断がなされ、MP0 陽性率が確定し、さらに FLT3 ITD の有無が判明している症例を用いて両者の予後因子としての関連を検討した。白血病芽球の 50%以上で MP0 陽性の例を MP0 陽性高率群 (MP0-high)、50%未満を低率群 (MP0-low) とした。FLT3 ITD の有無と MP0 によるグループの、予後に対する関係を検討し、ITD(-)/MP0-high のみが生存率がよく、他のグループはいずれも低下した。ITD(+)/MP0-high の症例は、ITD(-)/MP0-high より明らかに生存率は悪く、ITD の影響があると考えられた。MP0-low のグループでは ITD の有無によって生存期間に相違は認められなかった予後因子としての独立性を検討するために、上記症例の中から (1) 染色体核型による予後群、(2) FLT3 ITD、(3) MP0 の全てが調べられている 69 例を対象に多変量解析を行った。その結果、MP0 と FLT3 ITD を用いたグループ、染色体群、初診時 PS が独立した因子として挙がってきた。

7) 急性リンパ性白血病 (ALL) の治療成績改善のため、フィラデルフィア (Ph) 染色体陽性 ALL に対して化学療法とイマチニブの併用療法 Ph+ALL202 試験を行い、その有効性と安全性を解析した。2005 年 2 月末の時点で 84 例の登録があり、そのうち 50 例を対象として、化学療法のみ ALL93 試験と比較解析を行った。症例の年齢中央値は 45 才で男性が 29 例、女性が 21 例であった。観察期間の中央値は 8.1 ヶ月であった。寛解率は 94%と、ALL93

試験における 51%を大きく上回った ($p<0.0001$)。重篤な副作用は、ALL93 試験と変わりなかった。77%において、観察期間中に BCR-ABL が検出されない分子学的寛解が得られた。Ph+ALL202 試験と ALL93 試験での 1 年生存率は 78% vs 57% ($p=0.0056$)、EFS は 60% vs 18% ($p<0.0001$) といずれも Ph+ALL202 試験の優位性が示された。

3 倫理面への配慮

臨床試験計画は、すべて倫理的、科学のおよび医学的妥当性の観点から、参加施設それぞれの IRB によって審査され、その承認を得ることを条件とした。臨床検体を用いた研究については、インフォームドコンセントを得たうえで連結可能匿名化を行い、特に遺伝子解析研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得て行った。